

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama enam bulan, dimulai dari bulan Februari hingga bulan Agustus 2017. Pelaksanaan kegiatan penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Pengembangan Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang yang berlokasi di Jalan Raya Tlogomas No. 246 Malang, Jawa Timur.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *bunsen burner*, *shaker*, *laminar air flow* (LAF), *autoclave*, mikropipet ukuran 0-10 μ l, 10-100 μ l dan 100-1000 μ l, beaker glass 1000 ml; 500 ml; 250 ml, erlenmeyer 1000 ml, 500 ml, 250 ml, tip mikropipet warna putih, kuning dan biru, *tube* volume 1500 μ l, jarum ose, *sentrifuge*, *beaker glass*, bunsen, tabung reaksi volume 30 ml, Cawan petri diameter 150 x 25 (mm), *erlemeyer* volume 1000 ml, botol duran volume 2000 ml dan 1000 ml, oven, *microwave*, spektrofotometer dan *vortex*

Bahan-bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah media mineral M63 terdiri dari KH_2PO_4 100 mM, KOH 75 mM, MgSO_4 0,16 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glukosa, FeSO_4 3.9 μ M, agarose, triptopan, reagen salsowski tanah rhizosfer dari tanaman perkebunan tanaman Jeruk dan Jambu, agen triptopan, reagen salsowski, kapas, plastik, ethanol absolut (96%), herbisida, insektisida, fungisida, dan aquades dan media mineral M63 standar.

3.3 Rancangan Percobaan

3.4 Tahapan Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksplorasi dan karakteristik secara makroskopis bakteri rhizobakter tanaman perkebunan (jeruk dan jambu).

Penaman sampel yang digunakan:

Tabel 1. Penamaan Sampel Penelitian

| Sampel tanah Jeruk | Sampel tanah Jambu |
|--------------------|--------------------|
| IP Jr T1 | IP J T1 |
| IP Jr T2 | IP J T2 |
| IP Jr T3 | IP J T3 |
| IP Jr T4 | IP J T4 |
| IP Jr T5 | IP J T5 |

Keterangan :

I : Ikhwan

P : Putro

Jr : Jeruk

J : Jambu

l : Sampel tanah

Semua sampel dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-4} .
dengan perlakuan sebagai berikut :

Perlakuan Uji IAA (*Indole Acetic Acid*)

Pemberian Triptopan 100 ppm

Dari adanya tiga pengujian tersebut, dilakukan tiga kali pengulangan disetiap perlakuan yang diberikan.

3.4.1 Sterilisasi Alat

Seluruh peralatan seperti cawan petri, tabung reaksi, erlemeyer, jarum ose yang akan digunakan dalam penelitian dicuci terlebih dahulu, selanjutnya dikeringkan dan dibungkus dengan kertas pembungkus. Khusus erlemeyer dan

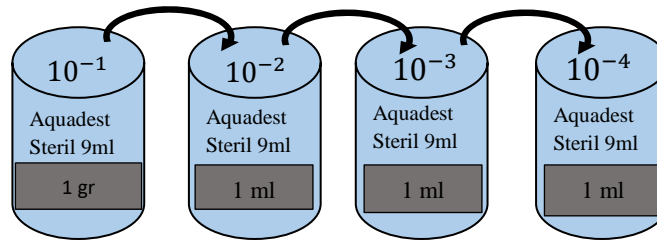
tabung reaksi bagian mulut labu dan tabung dibungkus dengan kertas *aluminium foil* lalu dibungkus dengan plastik. Sterilisasi alat menggunakan *autoclave* dengan suhu 121 °C selama 60 menit.

3.4.2 Pembuatan Media M63 Standart dan Sterilisasi Media

Menimbang bahan yang terdiri dari KH_2PO_4 100 mM, KOH 75 mM, MgSO_4 0.16 mM, FeSO_4 4 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15mM Glukosa 2 g dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 1000 ml (1L) menggunakan *beaker glass*. Kemudian mengaduk larutan tersebut hingga homogen. Selanjutnya memindahkan media M63 standar yang sudah larut ke dalam tabung reaksi, masing-masing tabung sebanyak 9 ml. Kemudian menutup tabung reaksi dengan kapas yang sudah steril, langkah selanjutnya adalah melakukan sterilisasi media menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.

3.4.3 Isolasi Rhizobakteria Tanaman perkebunan buah-buahan dengan Pengenceran Bertingkat dan *Pourplate*

Setelah melakukan tahapan sterilisasi alat dan media yang akan digunakan, tahap selanjutnya adalah pengisolasian bakteri pada rhizosfer tanah dengan menggunakan media M63 Standart. Langkah awal dari kegiatan ini adalah menyiapkan sampel tanah yang akan dimasukkan kedalam tabung sebanyak 1 gr, kemudian diberi aquadest steril sebanyak 9 ml, selanjutnya isolat divortex hingga homogen. Mengambil larutan isolat masing-masing sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung baru berisi 9 ml aquadest steril dan dihomogenkan kembali, kegiatan ini diulang hingga 5 (lima) kali dan setiap sampel tanah diulang 3 (tiga) kali.



Gambar 1. Proses Isolasi Bakteri Tanah dengan cara Pengenceran Bertingkat sampai 10^{-4}

Setelah itu memberi label pada masing-masing tabung reaksi sesuai pengenceran. Pelaksanaan dilakukan di ruang yang steril dengan menggunakan *Laminar Air Flow* (LAF). Kemudian diambil sebanyak 100 μ l dan dimasukkan kedalam Media M63 Standart yang berada di dalam *petridisk* lalu diratakan menggunakan draiglass dan ditunggu selama 3 hari kemudian dihitung koloni bakterinya (CFU), jika diangka 20-25 maka dianggap berhasil dan digunakan sebagai inokulan.

3.4.4 Pemurnian Bakteri dengan Cara Streak

Isolat bakteri yang sudah tumbuh pada media M63 Standart, selanjutnya dilakukan pemurnian pada media M63 Standart dengan metode penggoresan menggunakan jarum ose. Langkah awal dari pemurnian isolat bakteri adalah menyiapkan isolat bakteri yang sudah tumbuh. Kemudian diambil menggunakan ose dan melakukan penggoresan menggunakan jarum ose secara zig-zag kedalam *petridisk* berisi media M63 Standart. Selanjutnya memberi label pada masing-masing *petridisk* sesuai isolat bakteri yang ditumbuhkan. Isolat yang sudah ditumbuhkan diinkubasi selama 24 jam. Proses selanjutnya adalah melakukan identifikasi pada isolat yang sudah tumbuh, jika masih ada kontaminan maka dilakukan pemurnian kembali. Setelah selesai proses identifikasi isolat disimpan pada suhu 4 °C.

3.4.5 Pengujian Isolat Bakteri Sebagai Biofertilizer

Bakteri yang telah murni diambil, dimasukkan kedalam tabung reaksi berisi media M63 Standart kemudian diberi tambahan triptopan dengan dosis 250 mg/L. Setelah itu memvortexnya hingga homogen dan dilihat nilai absorbansi dengan spektrofotometer pada 0 jam pertumbuhan dengan panjang gelombang 600 nm. Kemudian di shaker selama kurang lebih 18-20 jam setiap 2 jam diamati pertumbuhan bakterinya dengan spektrofotometer yang kemudian didapatkan nilai OD (*Optical Density*). Sampel terakhir diambil 1 ml dimasukkan kedalam tube kemudian di sentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm (*rotary per minutes*). Terbentuklah supernatan dan natan yang kemudian diambil supernatannya sebanyak 700 μ l ditambahkan reagen salsowski 700 μ L lalu divortex dan dispektro dengan pajang gelombang 420 nm untuk melihat (Susilo, 2015).

3.4.6 Pengujian Produksi Hormon Pertumbuhan Menggunakan Gas Chromatograph Mass Spectrometer (GC-MS)

Langkah awal dalam pengujian produksi hormon pertumbuhan (ZPT) menggunakan GC-MS adalah isolat rhizobakteri tanaman jeruk dan jambu dalam larutan medium cair M63 + 1 mM triptofan 9 ml disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan diambil sebanyak 2,5 ml dan kemudian dilarutkan dengan etanol absolut sebanyak 2,5 ml (etanol absolut dalam keadaan dingin, yang sebelumnya disimpan pada suhu 40C selama \pm 4 jam). Selanjutnya larutan divortex hingga homogen. Setelah homogen, larutan disentrifus kembali dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit. Kemudian membuang supernatan dan meresuspensi hasil endapan (pellet) menggunakan etanol absolut sebanyak 200 μ l. Selanjutnya memindahkan hasil resuspensi ke dalam tube berukuran 1,5 ml. Tahap terakhir adalah melakukan uji produksi hormon

pertumbuhan 10 isolat rhizobakteri tanaman jeruk dan jambu menggunakan GC-MS. Kondisi GC-MS yang digunakan adalah sebagai berikut:

| | |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| GCMS apparatus model | : Shimadzu GCMS QP 2010 SE |
| Column (Phenomenex Inc) | : ZB - AAA (10 mL x 0,25 mmI.D) |
| Injection quantity | : 1 µl |
| Vaporization chamber temperature | : 280 °C |
| Column oven temperature | : 60 °C → (6 °C/min) → 220 °C |
| Control mode | : Constant pressure (15 kPa) |
| Injection mode | : split |
| Split ratio | : 127,5 |
| Carrier gas | : Helium |
| Interface temperature | : 280 °C |
| Ion source temperature | : 200 °C |
| Solvent elution time | : 0,4 min |
| Data sampling time | : 0,5 min to 7 min |
| Measurement mode | : Scan |
| Mass range | : m/z 20 - 600 (3,33 u/sec) |
| Event time | : 0.15 sec |
| Total flow | : 30 mL/min |
| Column flow | : 0,6 mL/min |
| Linear velocity | : 28,5 cm/sec |
| Purge flow | : 3,0 mL/min |
| Solvent cut time | : 2 min |
| Detector gain mode | : Relative |
| Detector gain | : 0,00 kV |
| Run time | : 60 minutes |
| GCMS method | : GCMS method |
| User name | : Ali Ikhwan, Dr, Univ Muhammadiyah |
| Malang | |
| Sample ID | : Sample 1 |
| Injection date | : 8/11/2017 |

Langkah selanjutnya adalah menghitung konsentrasi hormon yang dihasilkan dari 10 isolat bakteri rhizobakter tanaman perkebunan buah-buahan yang telah diuji menggunakan GC-MS. Perhitungan konsentrasi hormon pertumbuhan dalam sampel diperoleh dari nilai komposisi (%) hormon dibagi dengan tingkat pemekatan isolat sebanyak 25 kali (Syarifuddin, 2012).

3.4.7 Uji Biofertilizer

Bakteri yang telah murni diambil, dimasukkan kedalam tabung reaksi berisi media M63 Standart kemudian diberi tambahan *triptopan* dengan dosis 250 mg/L. Setelah itu memvortexnya hingga homogen dan dilihat nilai absorbansi dengan spektrofotometer pada 0 jam pertumbuhan dengan panjang gelombang 600 nm (nanometer). Kemudian di *shaker* selama kurang lebih 18-20 jam setiap 2 jam diamati pertumbuhan bakterinya dengan spektrofotometer yang kemudian didapatkan nilai OD (*Optical Density*). Sampel terakhir diambil 1 ml dimasukkan kedalam tube kemudian di *sentrifuge* selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm (*rotary per minut's*). Terbentuklah supernatan dan natan yang kemudian diambil supernatannya sebanyak 700 μ l ditambahkan reagen salsowski 700 μ l lalu divortex dan di spektro dengan pajang gelombang 420 nm untuk melihat .

3.5 Variabel Pengamatan

Adapun beberapa variabel pengamatan yang dilakukan dalam pengujian kali ini adalah

1. Pertumbuhan isolat rhizobakteria tanaman jeruk dan jambu pada Media M63 standar dan M63 + 100ppm Triptofan

Pertumbuhan isolat rhizobakteria tanaman Jeruk dan Jambu diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang λ 600 nm. Pertumbuhan bakteri diamati setiap 2 jam sekali selama 24 jam. Pengamatan dihentikan ketika pertumbuhan bakteri sudah memasuki fase stasioner atau sudah tidak menunjukkan pertumbuhan yang signifikan. Kecepatan pertumbuhan bakteri hingga fase eksponensial terakhir dapat dihitung menggunakan rumus: (nilai absorbansi eksponensial tertinggi – nilai absorbansi awal) : umur bakteri (jam) (Neldawati, Ratnawulan dan Gusnedi *et.al*, 2013).

2. Konsentrasi hormon pertumbuhan

Kemampuan produksi hormon pertumbuhan isolat rhizobakteria tanaman Jeruk dan Jambu diuji menggunakan *Gas Chromatograph Mass Spectrometer* (GC-MS). Konsentrasi hormon dari sampel dapat dilihat pada tabel berdasarkan nilai komposisi (%) hormon dibagi dengan tingkat pemekatan isolat (Syarifuddin, 2012).

1. Karakteristik bakteri

Parameter yang diamati dalam karakteristik bakteri ini bentuk koloni bakteri (bulat, takberaturan dengan permukaan cembung, cekung atau datar serta tepi koloni rata dan bergelombang), bentuk bagian tepian koloni (rata dan bergelombang), tekstur (licin seperti mentega, lengket dan kristal), dan warna koloni bakteri (merah, putih, merah muda, hijau, biru dan putih susu) (Fitri, 2011)

3.6 Analisis Data

Analisis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

1. Pendekatan pengukursn kepadatan pertumbuhan rhizobakteri menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm
2. Hasil analisis GCMS dikelompokkan berdsarkan jenis senyawa yang dihasilkan rhizobakteri tanaman jeruk dan jambu